

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/48</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22119</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 20. April 2000 (20.04.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/07613 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 11. Oktober 1999 (11.10.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 98119077.0 9. Oktober 1998 (09.10.98) EP <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> RUDOLPH, Rainer [DE/DE]; Körnerstrasse 37, D-06114 Halle (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> RATTENHOLL, Anke [DE/DE]; Senffstrasse 30, D-06120 Halle (DE). SCHWARZ, Elisabeth [DE/DE]; Körnerstrasse 37, D-06114 Halle (DE). GROSSMANN, Adelbert [DE/DE]; Heimgartenstrasse 1, D-82436 Eglfing (DE). <b>(74) Anwalt:</b> BEHNISCH, Werner; Reinhard-Skühra-Weise & Partner GbR, Friedrichstrasse 31, Postfach 44 01 51, D-80750 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BR, CA, JP, KR, US, ZA.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR OBTAINING ACTIVE $\beta$ -NGF <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON AKTIVEM $\beta$ -NGF <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for producing biologically active <math>\beta</math>-NGF from the proform proNGF. After expressing the proform of the <math>\beta</math>-NGF in a prokaryotic host cell, the recombinant protein is isolated in the form of insoluble inactive aggregates (inclusion bodies). After the solubilization thereof in a strong denaturing agent and the subsequent conversion thereof into the natural conformation, which is determined by the disulfide bridges present in the natural <math>\beta</math>-NGF, biologically active <math>\beta</math>-NGF is obtained by subsequently splitting-off the prosequence.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung von biologisch aktivem <math>\beta</math>-NGF, ausgehend von der Proform proNGF. Nach Expression der Proform des <math>\beta</math>-NGF in einer prokaryotischen Wirtszelle wird das rekombinante Protein in Form unlöslicher, inaktiver Aggregate (Inclusion Bodies) isoliert. Nach deren Solubilisierung in einem starken Denaturierungsmittel und anschließender Überführung in die natürliche Konformation, die durch die im natürlichen <math>\beta</math>-NGF vorhandenen Disulfidbrücken bestimmt ist, wird durch anschließende Abspaltung der Prosequenz biologisch aktiver <math>\beta</math>-NGF gewonnen.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Verfahren zur Gewinnung von aktivem $\beta$ -NGF

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von  $\beta$ -NGF durch Naturierung von denaturiertem, inaktiven proNGF und Abspaltung der Prosequenz.

Nervenwachstumsfaktor ( $\beta$ -NGF) ist ein neurotropher Faktor, der für das Wachstum und das Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen notwendig ist (Levi-Montalcini, R., *Science* 237 (1987) 1154; Thoenen, H. et al., *Physiol. Rev.* 60 (1980) 1284; Yankner, B.A. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 845).  $\beta$ -NGF unterstützt außerdem Wachstum, Differenzierung und Vitalität cholinergischer Neuronen des zentralen Nervensystems (Hefti, F.J., *J. Neurobiol.* 25 (1994) 1418). Mögliche therapeutische Indikationen für rekombinanten menschlichen Nervenwachstumsfaktor beinhalten periphere sensorische Neuropathien, z.B. bei Diabetes oder als mögliche Nebenwirkung bei der AIDS-Therapie. Weitere Indikationen für rh- $\beta$ -NGF stellen zentrale Neuropathien, z.B. die Alzheimersche Krankheit dar. Der Gedächtnisverlust wird hier durch den Verlust cholinergischer Neuronen hervorgerufen.

Menschlicher  $\beta$ -NGF wird als Präpro-Protein translatiert. Dieses besteht aus 241 Aminosäuren. Das Präpeptid (18 Aminosäuren) wird bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten, das entstandene Proprotein wird anschließend N- und C-terminal prozessiert (Abspaltung der Prosequenz (103 Aminosäuren) und der letzten beiden Aminosäuren). Reifer humaner NGF besteht folglich aus 118 Aminosäuren. Er ist homolog zum Maus- $\beta$ -NGF und unterscheidet sich von diesem Protein lediglich durch 12 Aminosäureaustausche. Für die Durchführung klinischer Studien oder einen möglichen Einsatz als Therapeutikum müssen große Mengen homogenen  $\beta$ -NGFs verfügbar sein. Eine natürliche Quelle größerer Mengen dieses Faktors sind die Submaxillardrüsen männlicher Mäuse. Diese Präparationen sind jedoch heterogene Gemische verschiedener Dimerer und daher für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Außerdem ist es wünschenswert, Patienten die humane Form des Proteins zu verabreichen. Neurotrophe Faktoren sind aber nur in verschwindend geringen Konzentrationen im menschlichen Gewebe vorhanden.

Für den Einsatz von  $\beta$ -NGF als Therapeutikum kommt deshalb nur die rekombinante Herstellung in Betracht. Hier bieten sich zwei Möglichkeiten an: die rekombinante Expression entweder in Zellkultur oder in Bakterien. Eukaryotische Zellexpressionssysteme liefern jedoch nur sehr geringe Proteinmengen und sind verhältnismäßig teuer (Barnett, J. et al., J.

Neurochem. 57 (1991) 1052; Schmelzer, C.H. et al., J. Neurochem. 59 (1992) 1675; US 5,683,894).

Im Gegensatz dazu werden mit prokaryotischen Expressionssystemen große Mengen des gewünschten Proteins erhalten. Bakterien sind jedoch im Gegensatz zu den eukaryotischen Expressionssystemen nicht in der Lage, die Vorläuferproteine korrekt zu prozessieren. Die Produktion rekombinanten  $\beta$ -NGFs führt in Bakterien, wie häufig bei der Expression von rekombinanten Säugergenen, zum biologisch inaktiven Translationsprodukt, welches dann in aggregierter Form in der Zelle abgelagert wird (sog. „Inclusion Bodies“ (IBs)).

Die Naturierung von reifem  $\beta$ -NGF aus derartigen Inclusion Bodies gelingt jedoch nur bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (unter 10  $\mu\text{g/ml}$ ) und bei sehr geringen Ausbeuten (bis ca. 10 %). Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in der EP-A 0 544 293, US-Patent 5,606,031, US-Patent 5,235,043 und WO 97/47735. Eine Naturierung über eine Sulfitolyse von neurotrophen Faktoren der NGF/BDNF-Familie wird in der WO 95/30686 beschrieben.

In der WO 97/47735 wird ein verbessertes Verfahren zur Naturierung von Proteinen beschrieben. In diesem Verfahren wird das inaktive Protein mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration in Gegenwart einer niedermolekularen Substanz, welche Thiolgruppen enthält, gelöst. Das gelöste Protein wird anschließend aus der stark denaturierenden Lösung in eine nicht oder nur schwach denaturierende Lösung überführt, in welcher es eine biologisch aktive Konformation annimmt, wobei die Disulfidbindungen mit der Thiolkomponente gelöst werden und im Protein intramolekular in der Weise neu gebildet werden, daß das Protein eine Konformation einnimmt, die biologische Aktivität aufweist. Mit einem solchen verbesserten Verfahren kann für  $\beta$ -NGF eine Naturierungsausbeute von ca. 10% erhalten werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von  $\beta$ -NGF zur Verfügung zu stellen, welches einfach ist und aktiven NGF in hohen Ausbeuten liefert.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Gewinnung eines biologisch aktiven  $\beta$ -NGF durch Naturierung der in inaktiver schwerlöslicher Form vorliegenden Proform, wobei die Proform (proNGF) vorzugsweise erhältlich ist in Form von Inclusion Bodies nach rekombinanter Herstellung in Prokaryoten, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist,

daß der proNGF in seiner inaktiven schwer löslichen Form mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration gelöst wird, anschließend unter Erhalt der Löslichkeit in eine nicht oder schwach denaturierende Lösung überführt wird und dabei gelöster denaturierter proNGF eine biologisch aktive Konformation annimmt, die durch die im natürlichen NGF vorliegenden Disulfidbrücken bestimmt ist und anschließend die Prosequenz abgespalten wird, wobei aktiver NGF erhalten wird, der isoliert werden kann.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die Prosequenz bei der Naturierung von inaktivem  $\beta$ -NGF in vitro einen wesentlichen und positiven Einfluß auf das Naturierungsverfahren hat und es erfindungsgemäß möglich ist, die Renaturierung auf einfachste Weise durchzuführen und dabei dennoch bisher nicht gekannte und für möglich gehaltene Ausbeuten an naturiertem, aktiven  $\beta$ -NGF zu erhalten.

Unter „proNGF“ ist  $\beta$ -NGF zu verstehen, welcher am N-Terminus mit seiner Prosequenz verknüpft ist. Erfindungsgemäß kann als Prosequenz entweder die gesamte Prosequenz (US-Patent 5,683,894; Ullrich, A. et al. Nature 303 (1983) 821; SWISS-PROT Protein Sequence Database No. P01138) oder Teile davon, vorzugsweise vollständige Domänen, verwendet werden. Suter et al. (EMBO J. 10 2395 (1991)) haben die in vivo-Funktion des Propeptids von murinem  $\beta$ -NGF hinsichtlich der korrekten Sekretion in einem COS-7-Zellkultursystem näher untersucht. Dazu wurde die Prosequenz in fünf Bereiche eingeteilt. Es wurden Mutanten hergestellt, in denen ein oder mehrere dieser Sequenzen deletiert wurden. Dabei wurde gefunden, daß die Sequenzbereiche mit den Aminosäuren -52 bis -26 („Domäne I“) sowie -6 bis -1 („Domäne II“) für die Expression und Sekretion von biologisch aktivem  $\beta$ -NGF essentiell sind. Domäne I ist wichtig für die Expression, während Domäne II die korrekte proteolytische Prozessierung bewirkt. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß proNGF in analoger Weise wie  $\beta$ -NGF eine Aktivität in vivo zeigt. proNGF kann damit ebenfalls als Therapeutikum verwendet werden.

Inaktiver, schwer löslicher proNGF entsteht bei der Überexpression des Proteins im Cytosol von Prokaryoten. Rekombinant hergestellter proNGF verbleibt dabei in unlöslicher und aggregierter Form im Cytoplasma. Derartige Aggregate von Proteinen, deren Isolierung und Reinigung sind beispielsweise in Marston, F.A., Biochem. J. 240 (1986) 1 beschrieben. Zur Isolierung dieser inaktiven Proteinaggregate (Inclusion Bodies) werden die prokaryotischen Zellen nach der Fermentation aufgeschlossen.

Der Zellaufschluß kann durch übliche Methoden durchgeführt werden, z.B. mittels Ultraschall, Hochdruckdispersion oder Lysozym (Rudolph, R. et al. (1997): Folding proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein Function: A Practical Approach. Oxford University Press, pp. 57-99). Er wird vorzugsweise in einer zur Einstellung eines neutralen bis schwach sauren pH-Werts geeigneten Pufferlösung als Suspensionsmedium durchgeführt, wie z.B. 0.1 mol/l Tris-HCl. Nach Zellaufschluß werden die unlöslichen Bestandteile (Inclusion Bodies) in beliebiger Weise abgetrennt, vorzugsweise durch Abzentrifugieren oder Filtration nach einem oder mehreren Waschschritten, mit Agentien, die IBs nicht zerstören, fremde Zellproteine jedoch möglichst lösen, z.B. Wasser oder Phosphatpuffer, ggf. unter Zusatz milder Detergentien, wie Brij®. Anschließend wird der unlösliche Anteil (Pellet) dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Solubilisierung und Naturierung unterworfen.

Als Denaturierungsmittel wird zweckmäßig ein für die Solubilisierung von Inclusion Body Proteinen üblicherweise verwendetes Denaturierungsmittel eingesetzt. Bevorzugt werden Guanidiniumhydrochlorid und andere Guanidiniumsalze, wie z.B. Thiocyanat sowie Harnstoff oder dessen Derivate, verwendet. Ferner können Gemische dieser Denaturierungsmittel verwendet werden.

Die Konzentration des Denaturierungsmittels ist von der Art des Denaturierungsmittels abhängig und für einen Fachmann ohne weiteres feststellbar. Die Konzentration des Denaturierungsmittels (denaturierende Konzentration) ist dann ausreichend, wenn eine vollständige Solubilisierung des denaturierten schwer löslichen Proteins erreicht werden kann. Für Guanidiniumhydrochlorid liegen diese Konzentrationen üblicherweise bei 3–8 mol/l, vorzugsweise 5 - 7 mol/l. Für Harnstoff liegen die Konzentrationen üblicherweise bei 6-10 mol/l. Unter einer schwach denaturierenden Lösung ist eine Lösung zu verstehen, welche ein Denaturierungsmittel in einer Konzentration enthält, welche die Verknüpfung der korrekten Disulfidbrücken im Protein und damit die Ausbildung der natürlichen Tertiärstruktur des Proteins ermöglicht. Vorzugsweise unterscheiden sich stark und schwach denaturierende Lösungen in der Konzentration um den Faktor 100 oder mehr.

Zur vollständigen Monomerisierung der Inclusion Body Proteine ist es weiterhin vorteilhaft, während der Solubilisierung zusätzlich ein Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) oder 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10-400 mM, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 20-100 mM zuzusetzen.

Nach der Solubilisierung wird vorzugsweise gegen eine Lösung, welche ein Denaturierungsmittel in einer denaturierenden Konzentration enthält, dialysiert, um ggf. eingesetztes Reduktionsmittel zu entfernen. Zweckmäßig enthält die Lösung, gegen die dialysiert wird, das Denaturierungsmittel in der gleichen Konzentration wie die Denaturierungslösung.

Die anschließende Naturierung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird im neutralen bis alkalischen pH-Bereich durchgeführt, vorzugsweise zwischen pH 7 und 10, besonders bevorzugt im pH-Bereich zwischen 7.5 und 9.5. Als Pufferlösungen sind alle üblichen Puffer geeignet. Vorzugsweise werden dem Fachmann bekannte Puffer, wie z.B. Tris- oder Phosphatpuffer, als Renaturierungspuffer verwendet. Zur Überführung des denaturierten Proteins in Renaturierungspuffer wird das solubalisierte Protein in den Renaturierungspuffer verdünnt oder gegen Renaturierungspuffer dialysiert. Dadurch wird das Denaturierungsmittel ebenfalls in seiner Konzentration so weit verdünnt (schwach denaturierende Lösung), daß eine weitere Denaturierung des Proteins nicht mehr erfolgt. Bereits während der anfänglichen Erniedrigung der Konzentration des Denaturierungsmittels kann ein Naturierungsprozeß erfolgen. Die Bedingungen für die Überführung des Proteins in die nicht oder schwach denaturierende Lösung müssen so gewählt sein, daß das Protein im wesentlichen in Lösung bleibt. Zweckmäßig kann dies durch eine langsame kontinuierliche oder eine schrittweise Verdünnung erfolgen. Dabei ist es bevorzugt, das Denaturierungsmittel so zu verdünnen, daß eine möglichst vollständige Naturierung des Proteins erfolgt, oder das Denaturierungsmittel beispielsweise durch Dialyse nahezu vollständig zu entfernen.

Die Naturierung erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von niedermolekularen Hilfsstoffen, welche die Ausbeute bei der Naturierung positiv beeinflussen. Derartige Hilfsstoffe sind beispielsweise in US-Patent 5,593,865 beschrieben. Besonders bevorzugt wird als niedermolekularer Hilfsstoff bei der Naturierung Arginin verwendet, zweckmäßig in einer Konzentration von 0.2 bis 1.5 M.

Die Naturierung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt vorzugsweise unter Zusatz einer Thiolkomponente in reduzierter und oxidiert Form. Bevorzugte Thiolkomponenten sind z.B. Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiert Form (GSSG), Cysteamin und Cystamin, Cystein und Cystin oder 2-Mercaptoethanol und 2-Hydroxyethyl-disulfid. Zusatz dieser Thiolreagentien in reduzierter und oxidiert Form ermöglicht sowohl die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der sich faltenden Polypeptidkette während der Naturierung als auch das „Reshuffling“ falscher Disulfidbrücken innerhalb oder zwischen den sich faltenden Polypeptidketten (Rudolph et al. 1997, loc. cit.).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird zweckmäßig während der Naturierung bei niederen Temperaturen (vorzugsweise ca. 10°C) durchgeführt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Renaturierung während einer Dauer von 0.5-5 h, bevorzugt von 1-2 h, durchgeführt.

Zur Verhinderung der Oxidation des Reduktionsmittels durch Luftsauerstoff und zum Schutz freier SH-Gruppen ist es zweckmäßig, einen Komplexbildner, wie EDTA, vorzugsweise in einer Menge von 1-20 mM, besonders bevorzugt um ca. 10 mM zuzusetzen.

Unter der „Aktivität von  $\beta$ -NGF“ ist die biologische Aktivität von  $\beta$ -NGF zu verstehen. Biologisch aktiver  $\beta$ -NGF liegt als Dimer vor. Die Aktivität kann bestimmt werden nach dem DRG-Test (Dorsal Root Ganglionassay), Levi-Montalcini, R. et al., Cancer Res. 14 (1954) 49 und Varon, S. et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203. Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien aus Hühnerembryonen an Hand der Ausbildung von Neuriten untersucht.

Die Prosequenz stellt eine vom reifen Protein getrennte Domäne dar. Zwischen diesen Domänen befindet sich eine exponierte Proteasespaltstelle. Diese Spaltstellen lassen sich spezifisch mit geeigneten Proteasen schneiden. Trypsin beispielsweise schneidet nach basischen Aminosäuren wie Lysin oder Arginin. In einem geeigneten Verhältnis von proNGF zu Trypsin wird das korrekt gefaltete, mature Protein nicht von der Protease abgebaut. Denaturierte Proteine und auch Faltungsintermediate hingegen exponieren Sequenzen, die dem Angriff der Protease erliegen. Für die Prozessierung von proNGF werden Proteasen mit Trypsin-ähnlicher Substratspezifität bevorzugt. Diese Proteasen spalten das Protein, ohne den aktiven Teil des Proteinmoleküls abzubauen. Als Trypsin-ähnliche Proteasen kommen verschiedene Serin-Poteasen (z.B. Trypsin selbst oder  $\gamma$ -NGF) in Frage. Bevorzugt wird Trypsin eingesetzt. Für die limitierte Proteolyse wird das Protein in einem Masse-Verhältnis von 1:40 bis 1:2500 (Verhältnis Trypsin : proNGF) eingesetzt, bevorzugt wird ein Bereich von 1:40 bis 1:250. Die Proteolyse wird mit einer Inkubationszeit von 1 min - 24 h, bevorzugt 1 - 60 min bei einer Temperatur von 0°C bis 37°C, bevorzugt 0°C bis 20°C, durchgeführt. Als Puffer werden solche verwendet, die die Aktivität der Protease nicht hemmen. Bevorzugt sind Phosphat- und Tris-Puffer im Konzentrationsbereich von 10-100 mM. Die limitierte Proteolyse wird im Bereich des pH-Optimums der Protease durchgeführt, bevorzugt ist ein Milieu von pH 7-8. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Proteolyse gestoppt, entweder durch Zugabe eines spezifischen Inhibitors, bevorzugt 1-5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) oder Sojabohnen-Trypsininhibitor, bevorzugt 1 mg auf 0.1-5 mg Trypsin oder durch Erniedrigung



des pH-Werts auf pH 2-3 durch Zugabe von Säure, bevorzugt HCl (Rudolph, R. et al. (1997): Folding proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein Function: A Practical Approach. Oxford University Press, pp. 57-99, US Patent 5,683,894).

Die folgenden Beispiele, Publikationen und Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

**Figur 1** zeigt das proNGF-Plasmidkonstrukt pET11a-proNGF für die Expression von rekombinantem humanen proNGF.

**Figur 2** zeigt eine Coomassie-Färbung eines SDS-PAGE-Gels (15 %) mit Rohextrakten des E. coli-Stammes BL21(DE3) pET11a-proNGF/pUBS520 vor bzw. nach Induktion sowie einer IB-Präparation (SDS-PAGE nach Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680). U: Rohextrakt vor Induktion, I: Rohextrakt nach vierstündiger Induktion, P: IB-Pellet, S: löslicher Überstand).

**Figur 2a** zeigt den Einfluß des pH-Werts auf die Faltung von rh-proNGF bei 10°C in 100 mM Tris/HCl, 1 M L-Arginin, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, 5 mM EDTA. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml, die Faltungsdauer 3 Stunden. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.

**Figur 2b** stellt den Effekt unterschiedlicher L-Arginin-Konzentrationen auf die Faltung von rhpro-NGF dar. Es wurde bei einem pH-Wert von 9.5 renaturiert; die übrigen Bedingungen waren identisch mit denen der bei der pH-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.

**Figur 2c** zeigt den Einfluß verschiedener GSH-Konzentrationen auf die Faltung von rh-pro-NGF. Die GSSG-Konzentration betrug 1 mM, die L-Arginin-Konzentration 1 M. Die übrigen Renaturierungsparameter waren identisch mit denen bei der Arginin-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.

- Figur 2d** zeigt den Einfluß verschiedener GSSG-Konzentrationen auf die Renaturierung von rh-proNGF. Die GSH-Konzentration betrug 5 mM. Die restlichen Faltungsparameter waren identisch mit denen bei der GSH-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.
- Figur 2e** stellt den Einfluß verschiedener GdmCl-Gehalte auf die Ausbeute von nativem rh-proNGF dar. Der Gehalt an GSH bzw. GSSG betrug 5 mM bzw. 0.5 mM. Die anderen Renaturierungsbedingungen waren identisch mit denen bei der GSSG-Variation benutzten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.
- Figur 2f** zeigt den Effekt unterschiedlicher Proteinkonzentrationen auf die Faltungsausbeute von rh-proNGF. Die GdmCl-Konzentration betrug in allen Ansätzen 200 mM. Alle anderen Faltungsparameter waren identisch mit denen bei der GdmCl-Variation verwendeten. Dargestellt ist eine Meßreihe.
- Figur 3** zeigt das Elutionsprofil der Reinigung von rh-proNGF mittels Kationen-Austauschchromatographie an Poros 20 HS (Perseptive Biosystems, Säulenvolumen 1.7 ml).
- Figur 4** zeigt ein SDS-PAGE-Gel (15 %, Silberfärbung nach Nesterenko, M.V. et al., J. Biochem. Biophys. Methods 28 (1994) 239) der Reinigung von rh-proNGF an Poros 20 HS (1: Auftrag rh-proNGF-Renaturat, 2: Durchlauf, 3: Fraktion 4 (66 bis 69 ml), 4: Fraktion 5 (69-72 ml), 5: Fraktion 6 (72-75 ml), 6: Fraktion 7 (75-78 ml), 7: Fraktion 8 (78-81 ml), 8: Fraktion 9 (81-84 ml), 9: Fraktion 10 (84-87 ml)).
- Figur 5** zeigt das UV-Spektrum von rh-proNGF.
- Figur 6** zeigt ein IEX-HPLC-Elutionsdiagramm von rh-proNGF (Säulenmaterial: Poros 20 HS, 100 mm x 4.6 mm Säule, Fa. Perseptive Biosystems).
- Figur 7** zeigt ein RP-HPLC-Elutionsdiagramm von rh-proNGF bei 220 nm (Säule Poros 10 R1; 100 mm x 4.6 mm; Perseptive Biosystems).

**Figur 8** zeigt ein SDS-Gel (15 % Coomassie-Färbung) der limitierten Proteolyse von rh-proNGF mit Trypsin (M: 10 kDa-Marker, 1: rh-proNGF-Standard, 2: rh- $\beta$ -NGF-Standard, 3: Masseverhältnis Trypsin : rh-proNGF = 1 : 40, 4: 1 : 100, 5: 1 : 250, 6: 1 : 500, 7: 1 : 1000, 8: 1 : 2000, 9: 1 : 2500, 10: Kontrolle ohne Trypsin, mit STI).

**SEQ ID NO: 1 und 2** zeigen Oligonukleotide zur Konstruktion von pET11a-proNGF.

**SEQ ID NO: 3** zeigt die Nukleotidsequenz der cDNA von humanem proNGF sowie die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

**SEQ ID NO: 4** zeigt die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

### **Beispiel 1**

#### **Klonierung der proNGF-cDNA in einen Escherichia coli-Expressionsvektor**

Für die Klonierung des proNGF-Konstrukts wurde das T7-Expressionssystem von Novagen gewählt (Studier, F.U. et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113). Die für proNGF codierende DNA-Sequenz steht unter der Kontrolle des starken T7 Transkriptionssignals. Als Wirtstamm wird E. coli BL21 (DE3) verwendet. Das Chromosom enthält das Gen für die T7 RNA-Polymerase. Die Expression dieser RNA-Polymerase und damit des rh-proNGFs wird durch IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) induziert.

Die cDNA für humanen proNGF wurde durch PCR-Amplifikation aus dem Vektor pMGL-SIG-proNGF von Boehringer Mannheim erhalten (PL-Nr. 1905). Durch Mutageneseprimer wurde am 5'-Ende der für proNGF codierenden DNA-Sequenz eine NdeI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde in die NdeI/BamHI-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pET11a (Novagen) inseriert (Fig. 1).

Es wurden folgende Primer für die PCR benutzt:

#### **Forward Primer „FwProNGF“:**

5'- CG GAA TTC CA | T ATG GAA CCA CAC TCA GAG AGC -3' (SEQ ID NO: 1)  
Met Glu Pro His Ser Glu Ser

**Reverse Primer „RevNGF,,:**

5'- CC G|GA TCC TTA TCA TCT CAC AGC CTT TCT AGA-3' (SEQ ID NO 2)  
Stop Stop Arg Val Ala Lys Arg Ser

Nach der Klonierung in den Vektor wurde die Nucleotidsequenz mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

**Beispiel 2****a) Expression von humanem proNGF in E. coli**

Für die Anzucht des rekombinanten Bakterienstamms wurde eine Übernachtskultur bereitet. Dazu wurde ein geeignetes Volumen LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin versetzt.

**LB-Medium (1 l):** 10 g Trypton,  
10 g Hefeextrakt,  
5 g NaCl.

Das Medium wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurde das gewünschte Volumen 2×YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin im Verhältnis 1:100 (v/v) mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 200-250 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.5-0.8 erreicht war. Danach wurde die Expression von proNGF mit 3 mM IPTG 4 h lang bei gleicher Temperatur induziert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und entweder sofort aufgeschlossen oder bei -70°C eingefroren.

**2×YT-Medium (1 l):** 17 g Trypton,  
10 g Hefeextrakt,  
5 g NaCl.

### **b) Isolierung der IBs**

Das rekombinante Protein fällt in den Bakterienzellen in aggregierter Form an. Die Präparation dieser „Inclusion Bodies“ wurde durchgeführt nach Rudolph, R. et al. (1987): Folding Proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99.

Für den Zellaufschluß wurden jeweils 5 g Zellpellet in 25 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 1 mM EDTA resuspendiert. Danach wurden 1.5 mg Lysozym pro g Zellfeuchtmasse hinzugegeben, 30 min bei 4°C inkubiert und die Zellen anschließend mit dem Gaulin-Zellaufschlußgerät aufgebrochen. Dann wurden 3 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 10 µg/ml DNase zum Rohhomogenat gegeben und 30 min bei 25°C inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zugabe von 0.5 Volumenanteilen 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1.5 M NaCl pH 7.0 und anschließende dreißigminütige Inkubation bei 4°C solubilisiert. Die IBs wurden 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Sie wurden dann noch viermal mit je 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 20 mM EDTA gewaschen und bei -20°C aufbewahrt.

Aus 10 l E. coli-Kultur (ca. 44 g Zellfeuchtmasse) wurden auf diese Weise reproduzierbar ca. 4 g IB-Pellet erhalten. Die Präparationen enthielten stets etwa 90-95% rh-proNGF (Fig. 2).

### **Beispiel 3**

#### **a) Solubilisierung der IBs**

400 mg IB-Pellet wurden in 2 ml Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0; 6 M GdmCl; 100 mM DTT; 10 mM EDTA) suspendiert, 2 h bei 25°C inkubiert und 30 min bei 13.000 rpm im Kühlraum abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit 1 M HCl auf pH 3-4 gebracht. Das Solubilisat wurde dreimal gegen 300 ml 6 M GdmCl pH 4.0; 10 mM EDTA dialysiert, und zwar zweimal je 2 h bei 25°C und einmal über Nacht im Kühlraum (12°C; 16-18 h). Die Proteinkonzentration wurde dann nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, M.M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248). Die Konzentration an rh-proNGF betrug zwischen 40 und 50 mg/ml.

#### **b) Optimierung der Renaturierung von rh-proNGF**

Zur Darstellung von biologisch aktivem rh-pro-NGF aus den in Beispiel 3a) hergestellten Solubilisaten wurden diese in verschiedene Renaturierungspuffer verdünnt. Zur Ermittlung der

optimalen Faltungsbedingungen wurden folgende Parameter in der angegebenen Reihenfolge variiert:

- a) Temperatur und Zeit,
- b) pH-Wert,
- c) Arginin-Konzentration,
- d) GSH/GSSG-Konzentration,
- e) GdmCl-Konzentration,
- f) Proteinkonzentration.

Die Ergebnisse sind in Tabellen 1-2 sowie Fig. 2a-f dargestellt. Die Menge an renaturiertem rh-proNGF in den Faltungsansätzen wurde mit RP-HPLC bestimmt. Dazu wurden zu bestimmten Zeiten je 925 µl der Faltungsansätze mit 75 µl 32%iger HCl versetzt und dadurch die Faltungsreaktion gestoppt. Für die RP-HPLC-Analytik wurde eine Poros 10 R1-HPLC-Säule und das HPLC-System Beckman Gold mit 125NM Solvent Module, 168 Detektor, Autosampler 507 und Auswertesoftware „Gold V 8.10“ verwendet. Die erhaltenen Elutionspeaks wurden mit dem Programm „Peakfit“, Version 2.01, gefittet. Zur quantitativen Bestimmung der Ausbeuten wurde eine Eichgerade mit gereinigtem, nativen rh-proNGF erstellt. Da die rh-proNGF-IBs sehr sauber waren, wurde bei der quantitativen Auswertung die zur Renaturierung eingesetzte Gesamtproteinmenge mit der von rh-pro-NGF gleichgesetzt. Bei den dargestellten Meßergebnissen handelt es sich um Durchschnittswerte aus je zwei Messungen.

### **Tabelle 1**

Optimierung von Temperatur und Zeit bei der rh-pro-NGF-Faltung. Die Proteinkonzentration betrug in jedem Renaturierungsansatz 50 µg/ml. Der Faltungspuffer bestand aus

100 mM Tris/HCl pH 9.5,  
1 M L-Arginin,  
5 mM GSH,  
1 mM GSSG,  
5 mM EDTA.

Die Meßreihen wurden mehrfach durchgeführt und mit einer Exponentialfunktion gefittet. Dargestellt sind die Durchschnittsergebnisse zweier Messungen.

Temperatur [°C]	Endausbeute [%]	Plateau erreicht nach ca.	Geschwindigkeits- konstante $k$ [s <sup>-1</sup> ]
4	25.8	3.3 h	$2.596 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
10	29.0	1.6 h	$4.865 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
15	22.4	1.1 h	$6.399 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
20	12.0	1.0h	$1.065 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
25	11.4	0.8 h	$1.935 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

**Tabelle 2**

Hier ist der Einfluß verschiedener GSH/GSSG (GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion) auf die Faltung von rh-proNGF dargestellt. Als Renaturierungspuffer wurde

100 mM Tris/HCl pH 9.5,  
1 M L-Arginin,  
5 mM EDTA

verwendet. Die Faltungsdauer betrug 3 h bei 10°C. In der Tabelle sind die einzelnen Faltungsansätze nach abnehmender Ausbeute geordnet. Angegeben sind die durchschnittlichen Ausbeuten aus zwei Meßreihen.

Nr. des Ansatzes	GSH/GSSG-Verhältnis [mM]	Ausbeute [%]
1	5/0.5	37.7
2	5/1	35.0
3	5/5	34.0
4	5/2.5	33.1
5	1/1	29.4
6	5/10	27.6
7	5/20	26.0
8	2.5/1	22.1
9	10/1	21.2
10	1/5	18.9
11	20/1	10.9
12	0/1	9.85
13	0/0	0
14	5/0	0

#### c) Renaturierung von rh-proNGF im präparativen Maßstab

Rh-proNGF wurde durch Verdünnung in Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9.5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 0.5 mM GSSG; 5 mM EDTA) renaturiert. Dabei wurde bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml gefaltet. Der Renaturierungsansatz wurde 3 h bei 10°C inkubiert.

#### d) Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

Das Renaturat wurde gegen 10 l 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA (IEX-Puffer A) dialysiert und 30 min bei 20000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Poros 20 HS-Säule (1.7 ml) aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten eluiert (IEX-Puffer B: 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 M NaCl; 1 mM EDTA). Das Protein eluiert bei 980 mM NaCl (Fig. 3). Nicht nativer rh-proNGF läßt sich nur unter denaturierenden Bedingungen von der Säule entfernen.



**Beispiel 4****Charakterisierung von rh-proNGF****a) Konzentrations- und Molekulargewichtsbestimmung mit UV-Spektralphotometrie**

Zur Konzentrationsbestimmung von rh-proNGF in den gereinigten Proben wurde ein UV-Spektrum von 240 bis 340 nm von gegen 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA dialysierten Proben gemessen (Fig. 5; das Spektrum wurde aufgenommen mit einem Beckman DU 640 Spectrophotometer). Die rh-proNGF-Konzentration der Probe wurde aus der Absorption bei 280 nm bestimmt. Für die Berechnung wurde ein theoretischer molarer Extinktionskoeffizient von 25680 l/(mol×cm) (berechnet nach Gill, S.C. et al., Anal. Biochem. 182 (1989) 319) und das Molekulargewicht von 24869 Da pro Monomer (berechnet mit dem ExPASy-Programm „pI/Mw“ und korrigiert für drei Disulfidbrücken) zugrundegelegt. Die durch das Spektrum ermittelten Werte stimmten gut mit den durch die Bradford-Methode bestimmten Konzentrationen überein. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mittels Elektrospray-Massenspektrometrie. Die theoretische Masse von rekombinantem proNGF beträgt 24869 Da. Experimentell wurden 24871 Da erhalten.

**b) Reinheitsanalyse und Molekulargewichtsbestimmung mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Es wurden 15%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Proben enthielten jeweils 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol. Rekombinanter humaner proNGF zeigt im SDS-Gel ein etwas höheres apparentes Molekulargewicht als erwartet: ca. 30 kDa (statt 24.8 kDa) (Fig. 2).

**c) Reinheitsanalyse mit IEX-HPLC**

24 µg (50 µl einer Probe mit 0.48 mg/ml rh-proNGF) Protein wurden auf eine mit 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA äquilibrierte Poros 20 HS-Säule aufgetragen (125 × 4 mm) und bei einer Flußrate von 5 ml/min mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % B (B = 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 2 M NaCl; 1 mM EDTA) in 10 Minuten eluiert (Fig. 6). Zur Detektion wurde die Absorption bei 280 nm benutzt (Gyncotek-HPLC-System mit Auswertesoftware Chromeleon Version 3.14).

**d) Reinheitsanalyse mit RP-C4-HPLC**

3.1 µg rh-proNGF (15 µl rh-proNGF mit einer Konzentration von 0.21 mg/ml) wurden auf eine mit 0.13% (v/v) TFA äquilibrierte Poros 10 R1-Säule (100 mm × 4.6 mm; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Protein wurde bei einer Flußrate von 0.8 ml/min mit einem nicht-linearen Gradienten innerhalb von 33 min eluiert (0-4 min: 6%B; 4-9 min: 6-30%B; 9-24 min: 30-69%B; 24-25 min: 69-100%B; 25-30 min: 100%B). Als Laufmittel B wurde 0.1% (v/v) TFA in 80% (v/v) Acetonitril verwendet. Zur Detektion wurde die Absorption bei 220 nm herangezogen (Beckman „Gold“-HPLC-System mit Auswertesoftware „Gold V 8.10“). Nativer rh-proNGF eluierte in einem einzigen Peak bei einer Retentionszeit von 14.28 min (Fig. 7).

**e) N-terminale Sequenzanalyse**

Für die N-terminale Sequenzanalyse wurden die mittels RP-HPLC grob gereinigten, solubilierten IBs verwendet. Die N-terminale Sequenz wurde mit einem Applied Biosystems 476A Protein Sequencer bestimmt. Es wurde folgende Aminosäuresequenz erhalten:

H<sub>2</sub>N-Met-Glu-Pro-His-Ser-Glu-Ser-Asn-Val

**f) Biologische Aktivität des rekombinanten humanen proNGF**

Die physiologische Aktivität von rh-proNGF wurde mit dem DRG-Test (= dorsal root ganglion assay) überprüft (Levi-Montalcini, R. et al. Cancer Res. 14 (1954) 49; Varon, S. et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203). Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien von 7-8 Tage alten Hühnerembryonen anhand der Ausbildung von Neuriten untersucht. Die rh-proNGF-Probe wurde mit Kulturmedium auf Konzentrationen von 0.019 bis 20.00 ng/ml eingestellt. Es wurden 15000 Neuronen pro Testansatz eingesetzt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt. Als Referenz wurde eine Lösung von rh-β-NGF mit bekannter Konzentration hinzugezogen. Bei der quantitativen Auswertung bezieht man sich auf den sogenannten EC<sub>50</sub>-Wert, d.h. derjenigen NGF-Konzentration, bei der die Hälfte aller Neuronen überleben. Für rh-proNGF ergibt sich ein EC<sub>50</sub>-Wert von 0.369 ng/ml. Im Vergleich dazu beläuft sich der EC<sub>50</sub>-Wert für den rh-β-NGF-Standard auf 0.106 ng/ml. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Molekulargewichte von rh-β-NGF und rh-proNGF,

so ergibt sich für reifen rh- $\beta$ -NGF eine etwa doppelt so große biologische Aktivität wie für rh-proNGF.

### **Beispiel 5**

#### **a) Gewinnung von biologisch aktivem, reifen rh- $\beta$ -NGF durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF**

Menschlicher proNGF besitzt als letzte Aminosäure der Prosequenz ein Arginin. Daher kann in vitro aus dieser Vorstufe durch limitierte Proteolyse mit Proteasen geeigneter Substratspezifität wie beispielsweise Trypsin reifer rh- $\beta$ -NGF erhalten werden.

500  $\mu$ l gereinigter rh-proNGF wurde gegen 50 mM Tris/HCl pH 8.0 dialysiert. Nach der Dialyse wurde mittels Aufnahme des UV-Spektrums eine Proteinkonzentration von 0.49 mg/ml gemessen. Pro Verdau-Ansatz wurden 20  $\mu$ g proNGF eingesetzt. Davon wurden nach der Proteolyse 3  $\mu$ g (entspricht 6  $\mu$ l) mittels SDS-PAGE analysiert. Als Trypsin-Stamm-lösungen wurden 0.1  $\mu$ g/ml bzw. 0.01  $\mu$ g/ml verwendet. Die Konzentration des Sojabohnen-Trypsin-Inhibitors (STI) betrug 1 mg/ml. Beide Proteine lagen als Lyophilisate vor (Hersteller: Boehringer Mannheim bzw. Sigma) und wurden in obigem Puffer gelöst.

Für die limitierte Proteolyse wurden unterschiedliche Trypsin/rh-proNGF-Masseverhältnisse eingesetzt (s. Tabelle 3). Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit je 5  $\mu$ g STI abgestoppt. Als Kontrolle wurde rh-proNGF ohne Zugabe von Protease ebenfalls auf Eis inkubiert und anschließend mit STI versetzt.

**Tabelle 3**

Verhältnis Trypsin:rh-proNGF	M(Trypsin) [ µg]	V(Trypsin) [µl]	V(rh-proNGF) [µl ]	V(STI) [µl]
1 : 40	0.5	5 (0.1 µg/ml)	40	5
1 : 100	0.2	2 (0.1 µg/ml)	40	5
1 : 250	0.08	0.8 (0.1 µg/ml)	40	5
1 : 500	0.04	4 (0.01 µg/ml)	40	5
1 : 1000	0.02	2 (0.01 µg/ml)	40	5
1 : 2000	0.01	1 (0.01 µg/ml)	40	5
1 : 2500	0.008	0.8 (0.01 µg/ml)	40	5
Kontrolle	-	-	20	2.5

**g) Analyse der Spaltprodukte durch N-terminale Sequenzierung**

Die Verdauansätze mit einem Massenverhältnis Trypsin : rh-proNGF von a) 1 : 40; b) 1 : 100 und c) 1 : 250 wurden durch N-terminale Sequenzierung näher untersucht. In der Bande bei 13 kDa fanden sich mehrere Spezies (Figur 8):

**N-Terminus 1:** Met<sup>-104</sup>....;

**N-Terminus 2:** Val<sup>-35</sup>....;

**N-Terminus 3:** Ser<sup>1</sup>...(reifer rh-β-NGF);

**N-Terminus 4:** Gly<sup>10</sup>....

Diese Peptide waren in den verschiedenen Ansätzen in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden.

Ansatz a): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 : N-Terminus 4 = 4 : 5 : 2.

Ansatz b): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 = 1 : 1; N-Terminus 4 in Spuren.

Ansatz c) wurde zusätzlich mittels RP-C3-HPLC analysiert (Säule: Nucleosil 500-5 C3-PPN; 125mm x 4 mm). Dabei fanden sich zwei Peaks: Peak 1 (12.32 min): N-Terminus 1; Peak 2 (14.88 min): N-Terminus 2 und N-Terminus 3 im Verhältnis 2 : 3.

Zur Gewinnung von maturem rh-β-NGF aus rh-proNGF im präparativen Maßstab wurden 1.3 mg rh-proNGF (in 50 mM Tris/HCl pH 8.0; Konzentration 0.46 mg/ml) im Masseverhältnis 1:250 (Trypsin : rh-proNGF) mit Trypsin versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert.

Danach wurde die Protease mit einem 40-fachen Masseüberschuß an Sojabohnen-Trypsin-inhibitor deaktiviert. Der Spaltansatz wurde gegen 50 mM Natriumphosphat pH 7.0; 1 mM EDTA dialysiert und anschließend auf eine Kationen-Austauschersäule (1.7 ml Poros 20 HS; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Spaltprodukt eluierte in einem einzigen Peak in einem linearen Salzgradienten von 0 bis 2 M NaCl. Die Elution bei einer Salzkonzentration von etwa 840 mM NaCl entsprach derjenigen von maturem rh- $\beta$ -NGF in einem Kontrollexperiment. Die Ausbeute an gereinigtem Spaltprodukt betrug 17%.

Die biologische Aktivität des gereinigten Spaltprodukts wurde mittels DRG-Assay getestet. Diese stimmte mit der Aktivität von reifem rh- $\beta$ -NGF überein (Tab. 4).

**Tabelle 4**

Spezies	EC <sub>50</sub> -Wert [pg/ml]
rh- $\beta$ -NGF	110
rh- $\beta$ -NGF, hergestellt durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF	171

#### **Referenzliste**

- Barnett, J. et al., J. Neurochem. 57 (1991) 1052  
 Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248  
 EP-A 0 544 293  
 Hefti, F. J., J. Neurobiol. 25 (1994) 1418  
 Hill, S. C. et al., Anal. Biochem. 182 (1989) 319  
 Laemmli, U. K., Nature 227 (1970) 680  
 Levi-Montalcini, R. et al., Cancer Res. 14 (1954) 49  
 Levi-Montalcini, R., Science 237 (1987) 1154  
 Marston, F.A., Biochem. J. 240 (1986) 1  
 Nesterenko, M. V. et al., J. Biochem. Biophys. Methods 28 (1994) 239  
 Rudolph, R. et al. (1997): Folding Proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99  
 Schmelzer, C. H. et al., J. Neurochem. 59 (1992) 1675  
 Studier, F.W. et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113  
 Suter, U. et al., EMBO J. 10 (1991) 2395  
 SWISS-PROT Protein Sequence Database No. P01138

- Thoenen, H. et al., *Physiol. Rev.* 60 (1980) 1284  
Ullrich, A. et al., *Nature* 303 (1983) 821  
US-Patent 5,235,043  
US-Patent 5,593,856  
US-Patent 5,606,031  
US-Patent 5,683,894  
Varon, S. et al., *Meth. in Neurochemistry* 3 (1972) 203  
WO 97/47735  
Yankner, B. A. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 845

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven  $\beta$ -NGF aus seiner inaktiven schwer löslichen Proform, erhältlich nach rekombinanter Herstellung in Prokaryonten, dadurch gekennzeichnet, daß proNGF in seiner inaktiven schwer löslichen Form mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration gelöst wird, anschließend unter Erhalt der Löslichkeit in eine nicht oder schwach denaturierende Lösung überführt wird und dabei denaturierter proNGF eine biologisch aktive Konformation annimmt, die durch die im natürlichen  $\beta$ -NGF vorliegenden Disulfidbrücken bestimmt ist, und anschließend die Pro-Sequenz abgespalten wird, wobei aktiver  $\beta$ -NGF erhalten wird, der isoliert werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht oder schwach denaturierende Lösung Arginin enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Arginin- Konzentration 0,2 bis 1,5 mol/l beträgt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Naturierung in Gegenwart einer Thiolkomponente in reduzierter und oxidierte Form erfolgt.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Abspaltung der Pro-Sequenz durch eine Protease erfolgt, welche eine Substratspezifität zur Spaltung nach der Aminosäure Arginin besitzt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Protease Trypsin verwendet wird.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Denaturierungsmittel Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff verwendet wird.

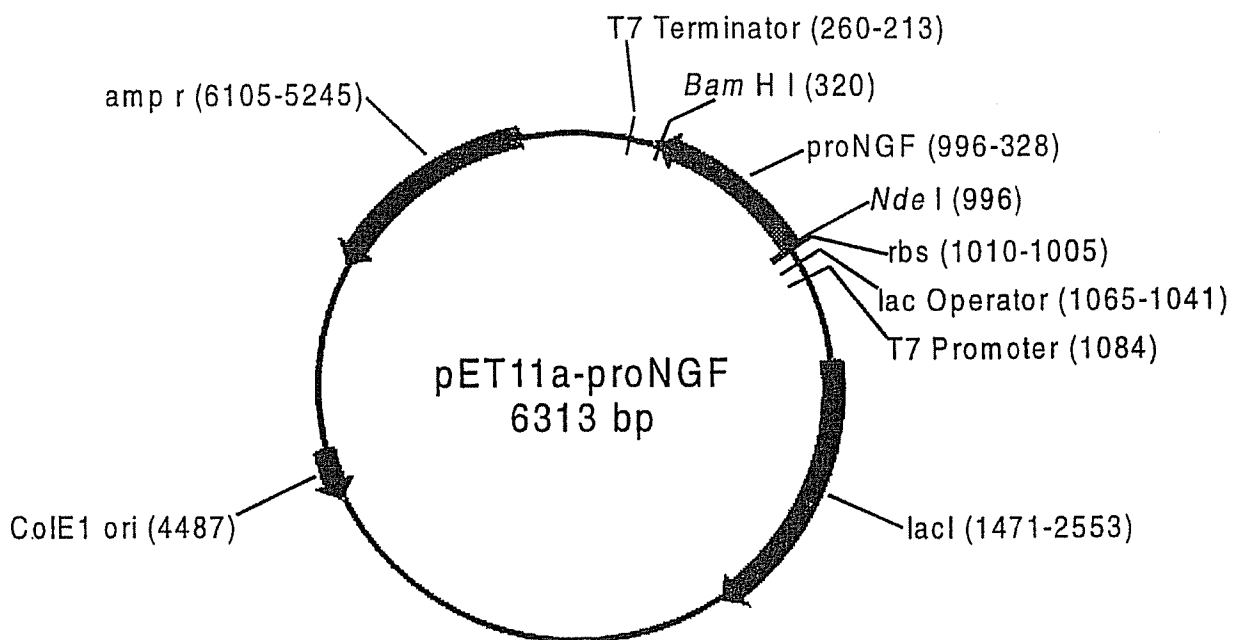
**Fig. 1**



Fig. 2

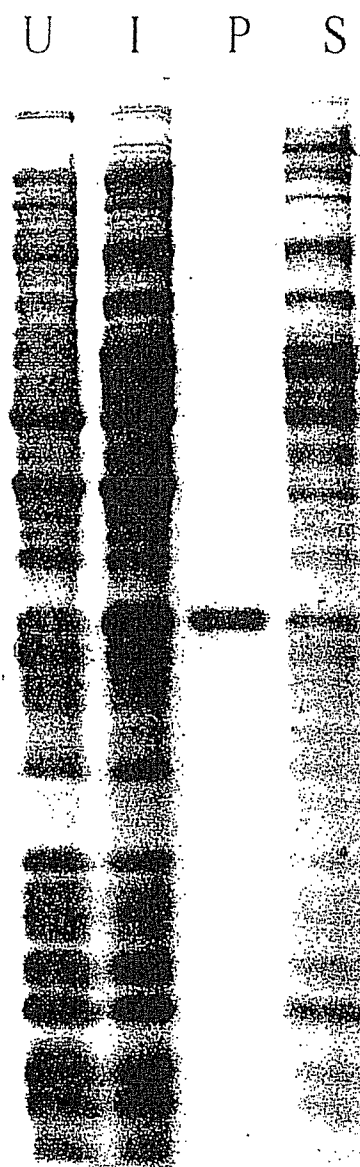


Fig. 2a

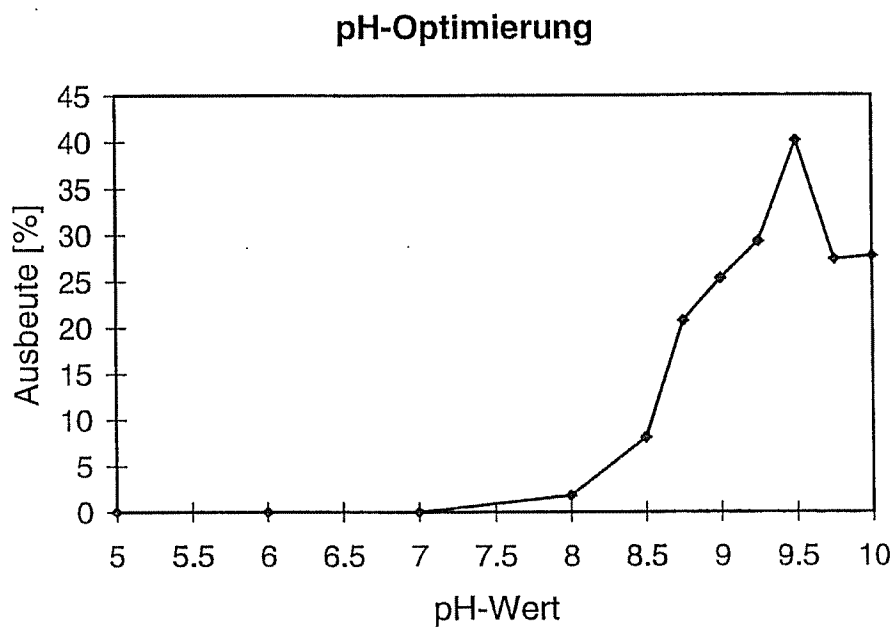


Fig. 2b

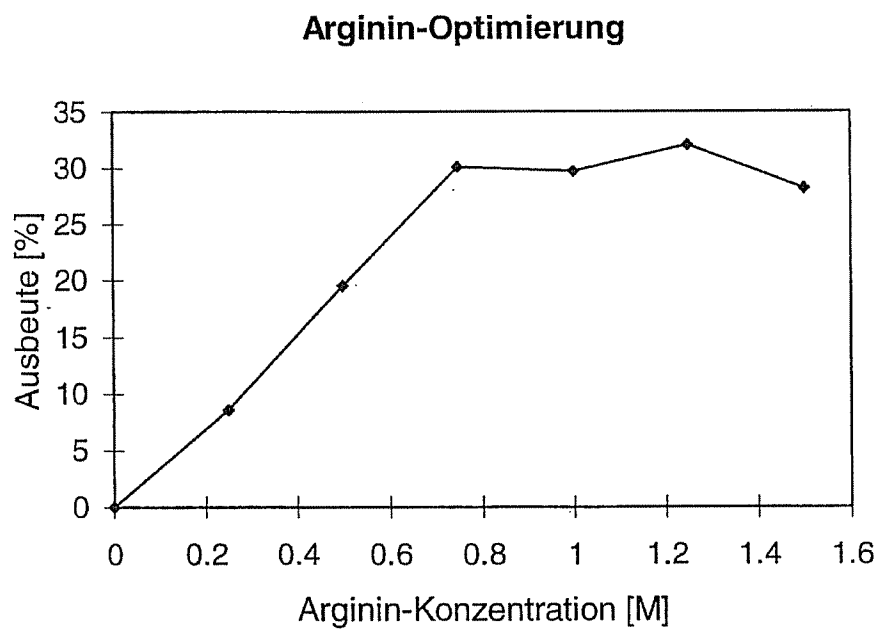


Fig. 2c

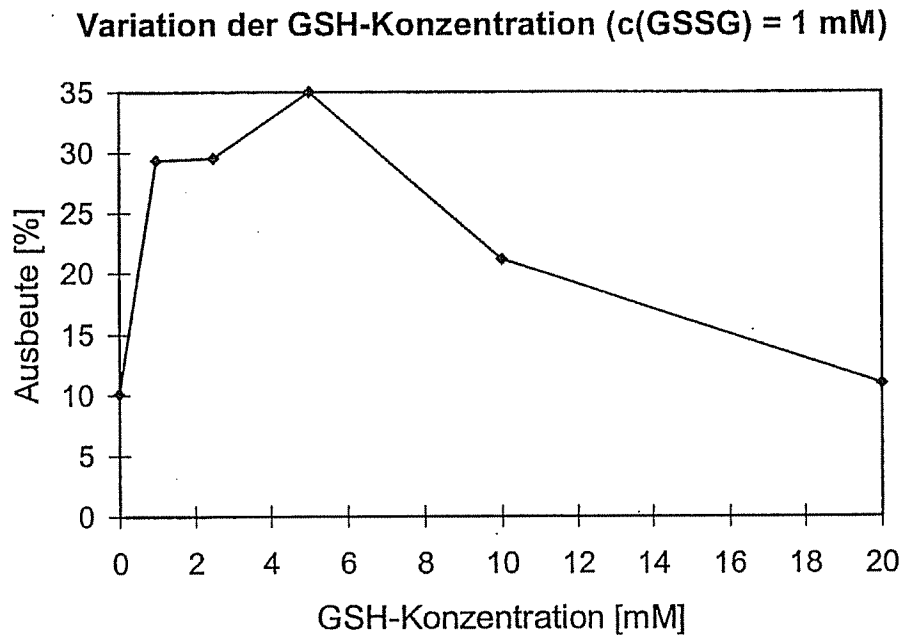


Fig. 2d

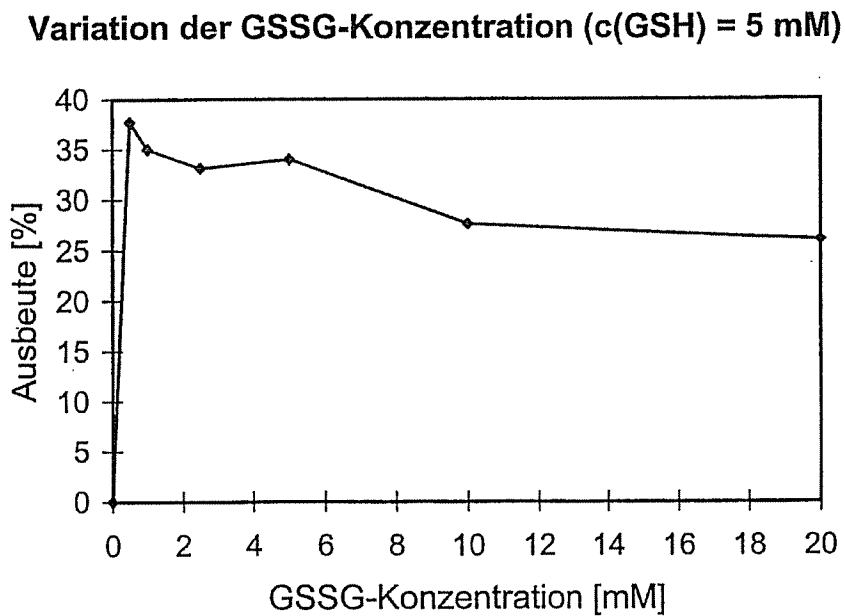


Fig. 2e

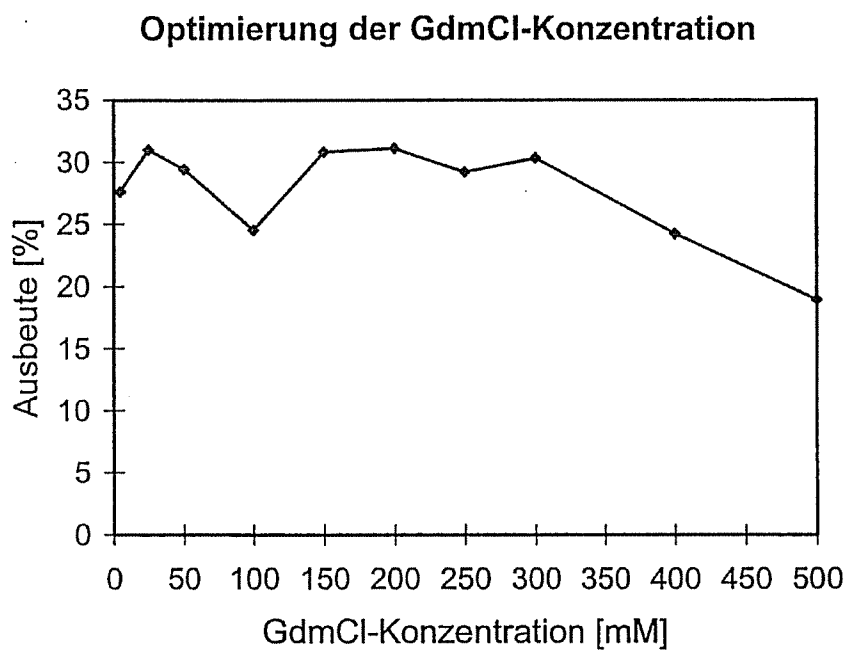


Fig. 2f

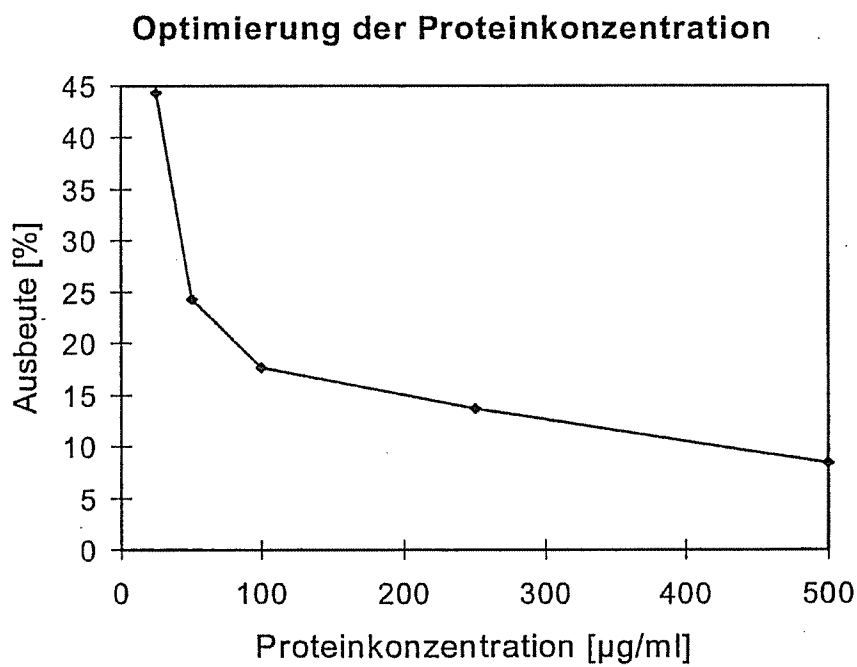


Fig. 3

## Elutionsprofil der Reinigung von rh-proNGF an Poros 20 HS

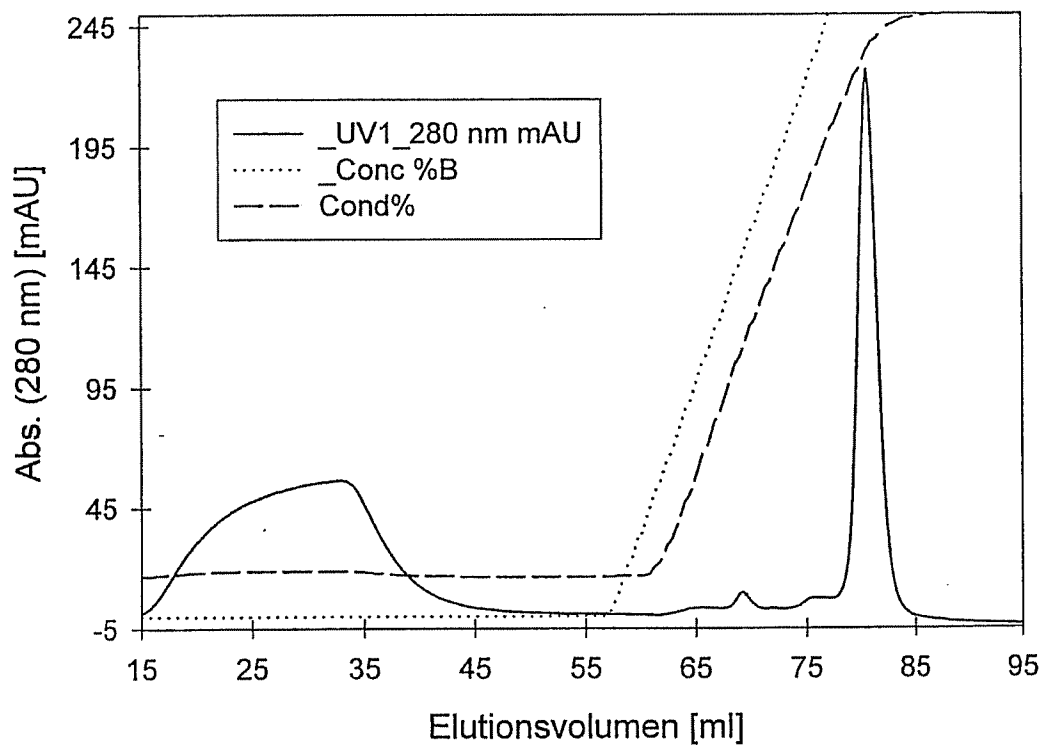


Fig. 4

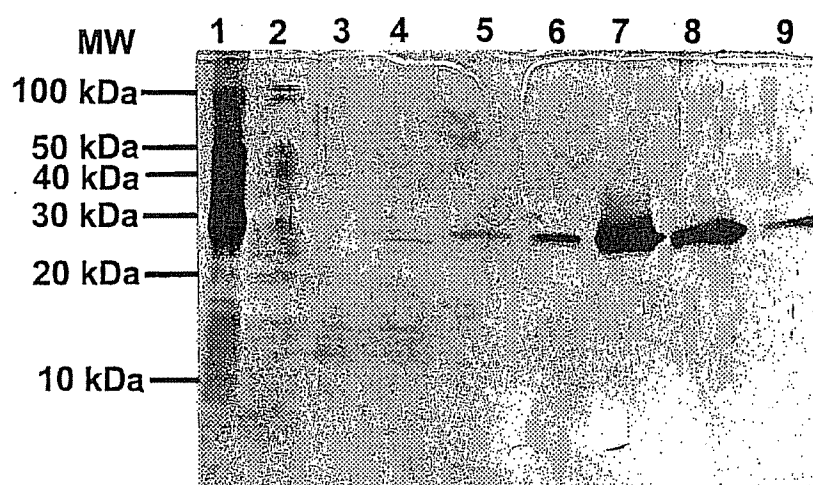


Fig. 5

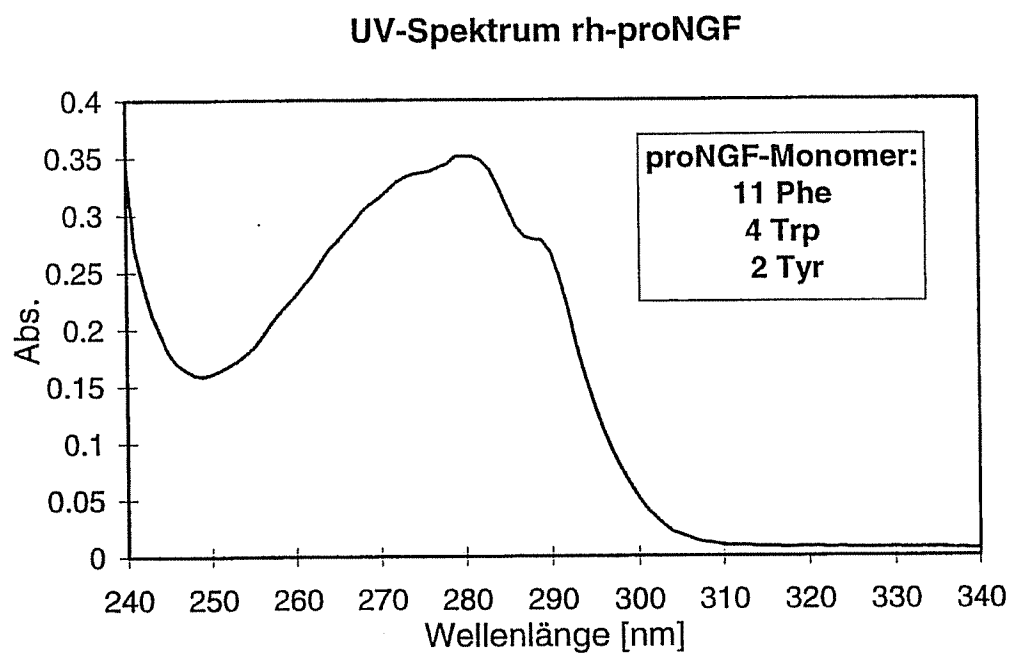
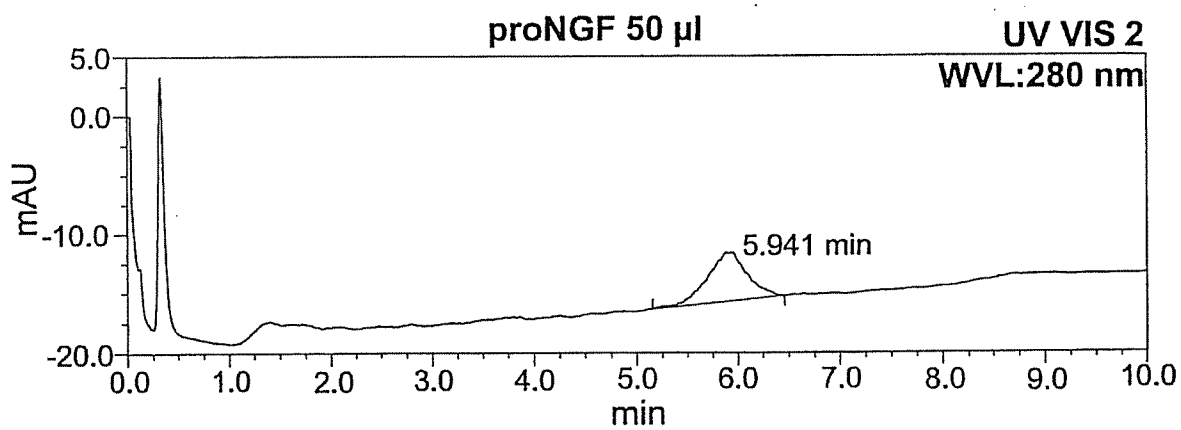
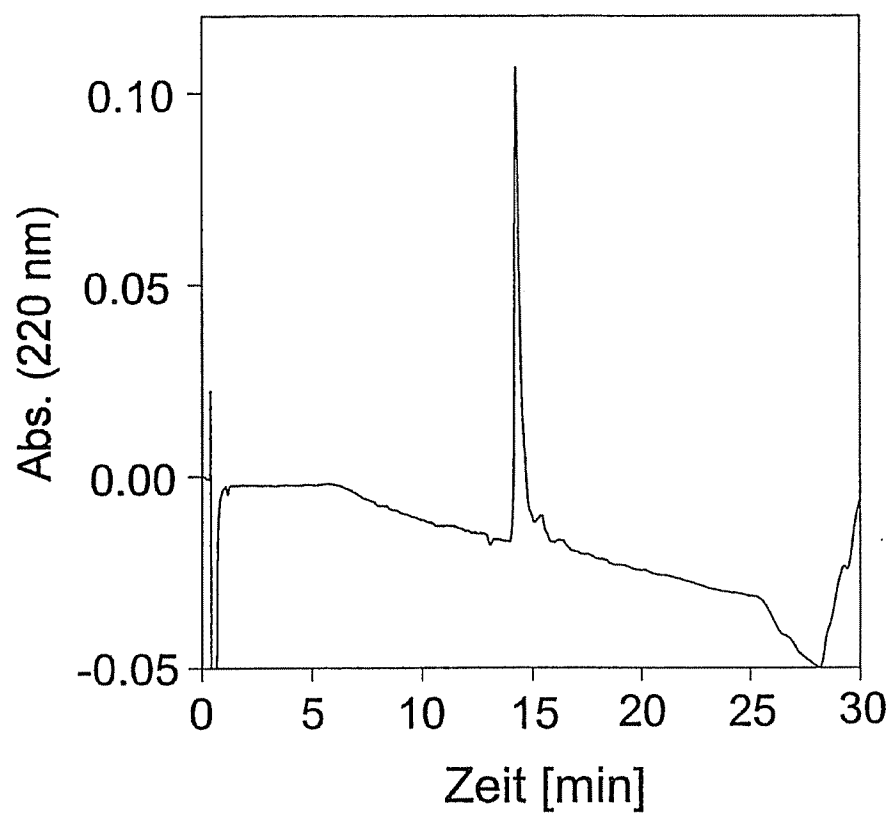
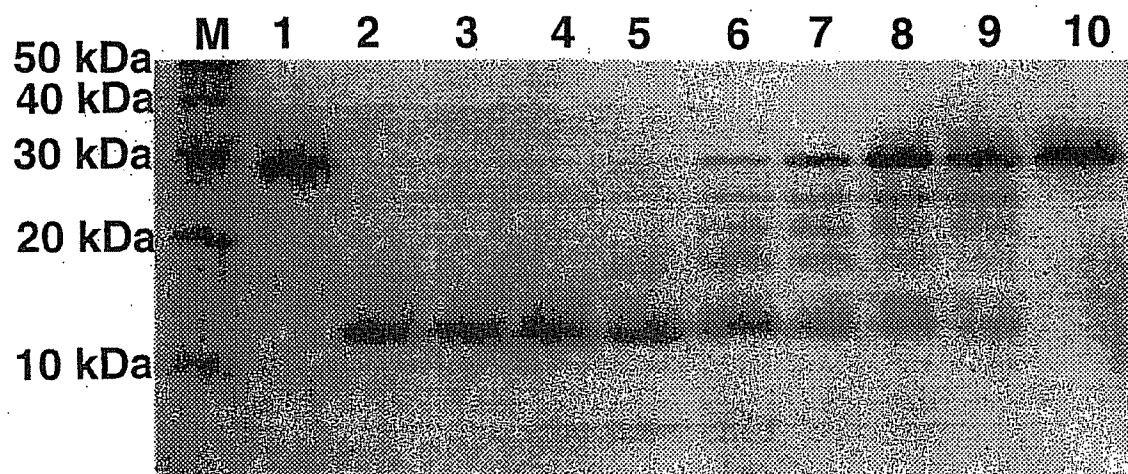


Fig. 6





**Fig. 7**

**Fig. 8**

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rudolph, Prof. Dr. Rainer

<120> Verfahren zur Gewinnung von aktivem beta-NGF

<130> P11700

<140>

<141>

<150> EP 98119077.0

<151> 1998-10-09

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: desc =  
Forward Primer - FwProNGF"

<400> 1

cggaattcca tatggaacca cactcagaga gc

32

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: desc =  
Reverse Primer - RevNGF

<400> 2

ccggatcctt atcatctcac agcctttcta ga

32

<210> 3

<211> 672

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(672)

&lt;400&gt; 3

atg gaa cca cac tca gag agc aat gtc cct gca gga cac acc atc ccc 48  
 Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

caa gtc cac tgg act aaa ctt cag cat tcc ctt gac act gcc ctt cgc 96  
 Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg  
 20 25 30

aga gcc cgc agc gcc ccg gca gcg gcg ata gct gca cgc gtg gcg ggg 144  
 Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

cag acc cgc aac att act gtg gac ccc agg ctg ttt aaa aag cgg cga 192  
 Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg  
 50 55 60

ctc cgt tca ccc cgt gtg ctg ttt agc acc cag cct ccc cgt gaa gct 240  
 Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

gca gac act cag gat ctg gac ttc gag gtc ggt ggt gct gcc ccc ttc 288  
 Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe  
 85 90 95

aac agg act cac agg agc aag cgc tca tca tcc cat ccc atc ttc cac 336  
 Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
 100 105 110

agg ggc gaa ttc tcg gtg tgt gac agt gtc agc gtg tgg gtt ggg gat 384  
 Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp  
 115 120 125

aag acc acc gcc aca gat atc aag ggc aag gag gtg atg gtg ttg gga 432  
 Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly  
 130 135 140

gag gtg aac att aac aac agt gta ttc aaa cag tac ttt ttt gag acc 480  
 Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

aag tgc cgg gac cca aat tcc gtc gac agc ggg tgc cgg ggc att gac 528  
 Lys Cys Arg Asp Pro Asn Ser Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp

165

170

175

tca aag cac tgg aac tca tat tgt acc acg act cac acc ttt gtc aag 576  
 Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys  
 180 185 190

gcg ctg acc atg gat ggc aag cag gct gcc tgg cgg ttt atc cgg ata 624  
 Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile  
 195 200 205

gat acg gcc tgt gtg tgt gtg ctc tct aga aag gct gtg aga tga taa 672  
 Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg  
 210 215 220

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 222

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg  
 20 25 30

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg  
 50 55 60

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe  
 85 90 95

Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
 100 105 110

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp  
 115 120 125

Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly  
 130 135 140

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr  
145 150 155 160

Lys Cys Arg Asp Pro Asn Ser Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp  
165 170 175

Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys  
180 185 190

Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile  
195 200 205

Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg  
210 215 220

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 99/07613

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 544 293 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2 June 1993 (1993-06-02) cited in the application abstract page 3, line 45 -page 4, line 34 page 4, line 54 -page 5, line 23 page 6, line 24 -page 7, line 1 ---	1-7
X	EP 0 786 520 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 30 July 1997 (1997-07-30) abstract page 3, line 9 -page 4, line 23 page 5, line 16 -page 7, line 29 page 13, line 39,40 --- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 2000

Date of mailing of the international search report

10.03.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07613

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SUTER U. ET AL.: "Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, vol. 10, no. 9, 1991, pages 2395-2400, XP002095460 cited in the application abstract page 2399</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 97 28272 A (TECHNOLOGENE INC. (US); SGARLATO G.D.) 7 August 1997 (1997-08-07) page 27, line 24 -page 29, line 21 page 101, line 11 -page 106; example 6</p> <p>-----</p>	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 99/07613

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0544293 A	02-06-1993	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0786520 A	30-07-1997
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994
EP 0786520 A	30-07-1997	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0544293 A	02-06-1993
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994
WO 9728272 A	07-08-1997	US 5935824 A	10-08-1999
		AU 1847497 A	22-08-1997
		EP 0910658 A	28-04-1999

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 99/07613

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/12 C07K14/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 544 293 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2. Juni 1993 (1993-06-02) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3, Zeile 45 -Seite 4, Zeile 34 Seite 4, Zeile 54 -Seite 5, Zeile 23 Seite 6, Zeile 24 -Seite 7, Zeile 1 ---	1-7
X	EP 0 786 520 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 30. Juli 1997 (1997-07-30) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 9 -Seite 4, Zeile 23 Seite 5, Zeile 16 -Seite 7, Zeile 29 Seite 13, Zeile 39,40 --- -/--	1-7

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Februar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10.03.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SUTER U. ET AL.: "Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF" THE EMBO JOURNAL, Bd. 10, Nr. 9, 1991, Seiten 2395-2400, XP002095460 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2399 ---	
A	WO 97 28272 A (TECHNOLOGENE INC. (US); SGARLATO G.D.) 7. August 1997 (1997-08-07) Seite 27, Zeile 24 -Seite 29, Zeile 21 Seite 101, Zeile 11 -Seite 106; Beispiel 6 -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07613

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0544293 A	02-06-1993	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0786520 A	30-07-1997
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994
EP 0786520 A	30-07-1997	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0544293 A	02-06-1993
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994
WO 9728272 A	07-08-1997	US 5935824 A	10-08-1999
		AU 1847497 A	22-08-1997
		EP 0910658 A	28-04-1999